不同炮制方法对黄连主成分含量及抗菌活性的影响

王 荣
湖南省临武县人民医院药剂科，湖南临武　424300

[摘要] 目的：研究黄连不同炮制品水煎剂中主成分含量的变化，探讨不同炮制方法对黄连抗菌活性的影响。方法：以小檗碱为黄连的代表成分，运用 HPLC 法测定 4 种不同黄连炮制品水煎剂中代表成分的含量。将黄连不同炮制品水煎液置于培养基中与细菌同时温育，观察药物对细菌生长繁殖的影响，以此判断药物抑菌作用的强弱。结果：黄连不同炮制品中小檗碱的含量明显不同，以药物最低抑菌浓度（MIC）显示黄连不同炮制品均有抑菌作用，但作用强弱不同。结论：不同炮制法不仅改变黄连药材的组分和含量，还可能通过影响其抗菌活性，使其药性及功能主治发生变化。

[关键词] 黄连；小檗碱；含量；抗菌活性
[中图分类号] R917　　[文献标识码] A　　[文章编号] 1673-7210(2012)01(a)-058-03

Influences of different processing methods on the content and the bacteriostasis effect in major constituent of *Coptis chinensis*

WANG Rong
Department of Pharmacy, the People's Hospital of Linwu County, Hu'nan Province, Linwu　424300, China

[Abstract] Objective: To investigate the content of major constituents in processed *Coptis chinensis* extracted by water, and to study the impact of different processing methods on the bacteriostasis effect. **Methods:** Berberine was chosen as representative constituent, of which the content in three differently processed *Coptis chinensis* extracted by water were determined by HPLC. Different processed products of *Coptis chinensis* in culture medium were put and cultivated with bacteria in the same time, and the influences of drugs on bacteria growth to judge the strength of bacteriostasis were observed. **Results:** The content of Berberine in differently processed *Coptis chinensis* were significantly different. It showed the bacteriostasis of different products all had the bacteriostatic action with MIC but in different strength. **Conclusion:** The content of major constituents and the bacteriostasis effect is changed by different means, different processing methods may transform the properties and functions of *Coptis chinensis*.

[Key words] *Coptis chinensis*; Berberine; Content; Bacteriostasis

黄连是临床常用的药材，据来源不同分为“味连”、“雅连”、“云连”等，主产于四川、云南、湖北等地。其始载于《神农本草经》，列为上品，具有清热燥湿、泻火解毒之功效。现代研究表明其有抗菌作用，且抗菌谱广，常用于解热镇痛、抗肠道细菌感染。

经不同方法炮制黄连后，其成分会发生不同程度的变化，可导致药性及功能主治的改变[1-2]。黄连的炮制种类繁多，其中酒黄连、姜黄连、萸黄连一直沿用至今，亦为药典收录。有学者以甲醇、乙醇等有机溶剂为提取溶剂对黄连不同炮制品提取物进行研究[3]，结合临床实际均是采用水煎剂入药。因此，本文选择黄连中小檗碱为主要有效成分代表，检测黄连不同炮制品水煎剂中小檗碱主要含量的变化[4-5]。不同炮制品的功效差异除与其有效成分有关，更与其抗菌活性密切相关[6]。本文研究了黄连不同炮制品中主要成分盐酸小檗碱含量的变化，及

[作者简介] 王荣（1975.5-），女，学士学位，中级职称；研究方向：中药学。

常，表明在本试验条件下，Beagle 犬灌胃给予 2 000 mg/kg 的供试品，耐受性较好。

在本试验条件下，参知健脑胶囊灌胃给予 Beagle 犬，安全剂量为 1 000 mg/kg，最大耐受量（MTD）大于 3 000 mg/kg。

[参考文献]

[1] 王永炎.关于提高脑血管疾病疗效难点的思考[J].中国中西医结合杂志,1997,17(2):195-196.
[2] 唐启盛.“浊毒痹阻脑络”对老年期痴呆的影响[J].北京中医药大学学报,1997,20(6):24-25.
[3] 李澎涛,王永炎,黄启福.“毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义[J].北京中医药大学学报,2001,24(1):1-6.
[4] 谢颖桢,邹忆怀,张云岭.血管性痴呆病因病机探讨[J].北京中医药大学学报,2000,23(6):1-3.
[5] 杨傲然,田昕,钟华,等.参知健脑片有效组分的最佳配伍筛选[J].中华中医药学刊,2009,27(12):2600-2602.
[6] 钟华,杨傲然,王宝见,等.参知健脑片组分对 β 淀粉样蛋白致 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J].山东医药,2009,49(31):22-24.
[7] 杨傲然,田昕,钟华,等.参知健脑片组方配伍对 Aβ 致阿尔茨海默病细胞模型细胞周期和凋亡率的影响[J].中华中医药学刊,2010,28(3):562-564.

（收稿日期：2011-10-17）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

其对常见菌株抗菌活性的影响，为其临床应用提供参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪（Agilent 1100，美国安捷伦公司）；超声波清洗器（KQ 3000，昆山市超声波仪器厂）；电子分析天平（BP211D，德国赛多利斯）；粉碎机（FW200，瑞安市永历制药机械有限公司）。

1.2 试药

盐酸小檗碱对照品（中国药品生物制品检定所，批号：100715-200821）；黄连药材（四川产，购于长沙中药饮片厂），经鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.；流动相所用甲醇、乙腈均为色谱纯（美国 Fisher 公司），水为纯化水。乙醇（广州化学试剂厂，分析纯），盐酸（汕头市光华化学厂，分析纯）。

金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、乙型溶血链球菌、沙门氏菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌由临武县人民医院检验科提供。培养基有两种处方，葡萄糖酚红肉汤培养基：牛肉浸出粉 0.5%、葡萄糖 1%、蛋白胨 2%、酚红 0.002%、氯化钠 0.5%、pH 7.4~7.6；固体培养基为营养琼脂培养基：牛肉膏 0.3%、琼脂 2%、蛋白胨 1%、氯化钠 0.5%、pH 7.2~7.4。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Eclipse XDB C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相：乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液（用磷酸调 pH 为 3.0，27:73）；柱温：30℃；流速：1.0 ml/min；检测波长：345 nm，理论塔板数在 3 000 以上。

2.1.2 供试溶液的制备

2.1.2.1 对照品溶液制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量，用甲醇制成每毫升含 0.01 mg 的溶液，摇匀，即为对照品溶液。

2.1.2.2 供试品溶液制备 取醇提干膏 0.05 g，加盐酸-乙醇溶液（1:100）100 ml，超声提取，滤过，取续滤液，定容，即为供试品溶液。

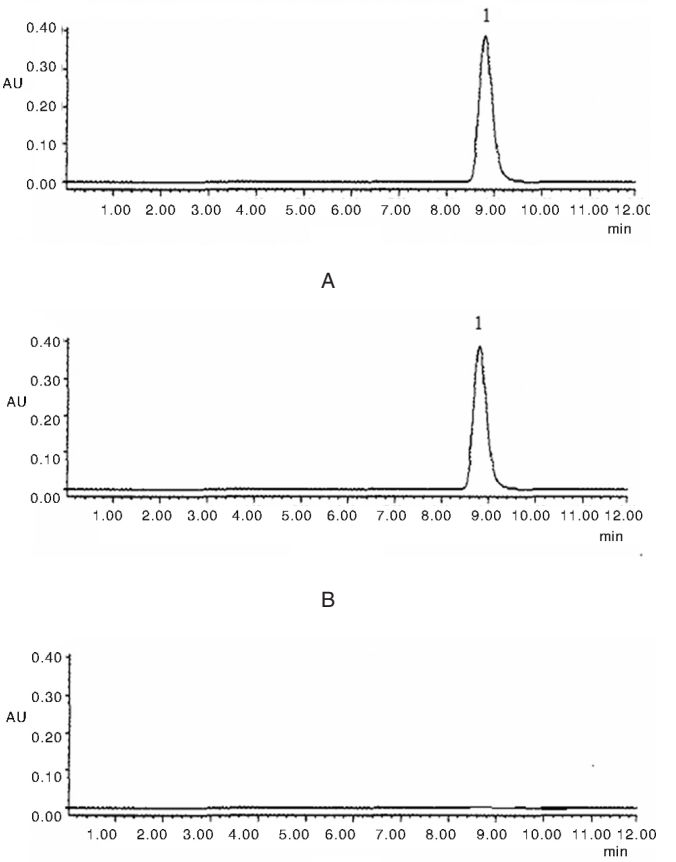
2.1.2.3 阴性对照溶液制备 按对照品溶液制备方法，除去盐酸小檗碱，制备阴性对照溶液。

以上溶液按“2.1.1”项下色谱条件进样，所得图谱见图1。

2.1.3 方法学考察

2.1.3.1 线性关系考察 精密称取对照品溶液，加甲醇稀释成 2.152 mg/ml 的溶液，精密吸取对照品溶液 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 ml 置于 10 ml 容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，混匀。各取 20 μl 按上述色谱条件测定。以对照品峰面积为纵坐标 Y，对照品进样量（μg）为横坐标 X，绘制标准曲线，得回归方程为：Y=19 675 506.032 2X+15 353.617 8，r=0.999 4，表明盐酸小檗碱在 0.107 6~4.304 0 μg 范围内线性关系良好。

2.1.3.2 精密度试验 分别精密吸取同一对照品溶液 1 μl，连续进样 5 次，求得盐酸小檗碱对照品峰面积的 *RSD*=6.2%。另外，于同一天不同时间分别进样测定，求得日内 *RSD*=4.56%（n=5）；于不同的 5 d 同一时间连续测定求得日间含量 *RSD*=1.68%（n=5），表明仪器精密度良好。



A.对照品溶液；B.供试品溶液；C.阴性对照溶液；1.盐酸小檗碱

图 1 黄连药材 HPLC 图谱

2.1.3.3 稳定性试验 按照“2.1.2.2”项下方法操作，考察同一供试品溶液放置 0、2、5、10、24 h 后盐酸小檗碱含量的变化，结果显示，其含量 *RSD*=0.51%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.3.4 重复性试验 按照“2.1.2.2”项下方法操作，对同一样品依法测定 6 次，进样测定盐酸小檗碱的含量，结果 *RSD*=1.18%，表明本法重复性良好。

2.1.3.5 加样回收率试验 精密移取盐酸小檗碱对照品溶液，加甲醇制成 5.38 mg/ml 对照品溶液，分别精密吸取上述溶液 0.8、1.0、1.2 ml，按低、中、高 3 个量级溶液，定容，过滤，同一量级平行操作 2 份，计算回收率，结果盐酸小檗碱的平均加样回收率为 98.6%，*RSD*=1.2%（n=5）。

2.2 黄连不同炮制品的制备

2.2.1 生黄连

取黄连原药材（成簇者掰开），除去泥沙等杂质，抢水洗净略润，切薄片，阴凉处干燥。

2.2.2 酒黄连

取黄连片 100 g，加入黄酒 12.5 g 拌匀，稍闷润，待酒被吸尽后，用文火加热，炒至表面色变深时，取出，摊凉，筛去碎屑。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.3 萸黄连

取吴茱萸 10 g，加适量水煎煮，取汁去渣，煎液与净黄连 100 g 拌匀，稍闷润，待药液被吸尽后，用文火加热，炒干，取出，摊凉，筛去碎屑。

2.2.4 姜黄连

取黄连片 100 g，用生姜 12.5 g 或干姜 4 g，绞汁或煎汁，取姜汁拌匀，稍闷润，待姜汁被吸尽后，用文火加热炒，炒至表面色变深时，取出，摊凉，筛去碎屑。

2.3 供试品溶液的制备

分别称取生黄连和 3 种黄连炮制品 20 g，经粉碎成粗粉备用。称取粗粉 10 g，加纯化水 100 ml 浸泡 0.5 h，先以武火加热，直至煮沸，改以文火加热，继续再煎煮 0.5 h。煎煮液以 4 层纱布过滤，收集滤液备用。滤渣加纯化水 100 ml，重复加热、煎煮提取 0.5 h，并过滤，收集滤液。合并 2 次滤液，水浴浓缩，直至浓缩至 20 ml，收集生黄连和 3 种黄连炮制品浓缩液，相当于含生药 0.5 g/ml。精密移取 4 种浓缩液各 2.5 ml，分别加入 95%乙醇 7.5 ml，搅拌均匀，静置 12 h，倾取药液上层液，得水提醇沉液，取适量 20 000 r/min 高速离心 20 min。取离心液上层清液，将上清液稀释 100 倍，相当含生药 1.25 mg/ml，制得样品溶液，备用。

2.4 黄连不同炮制品水煎剂中小檗碱的含量测定

分别精密吸取生黄连和 3 种黄连炮制品样品溶液各 10 μl 注入液相色谱仪，按照上述色谱条件测定，计算样品溶液中盐酸小檗碱含量，测定结果见表 1。结果显示各样品中小檗碱含量排序为：姜黄连>酒黄连>萸黄连>生黄连，其中姜黄连、酒黄连中盐酸小檗碱的含量明显高于萸黄连，而生黄连的含量则最低。

表 1　黄连生品及其不同炮制品中盐酸小檗碱含量测定结果(mg)

测定次数	生黄连	酒黄连	姜黄连	萸黄连
1	5.28	6.26	6.21	5.58
2	5.30	6.22	6.31	5.61
3	5.26	6.24	6.26	5.70
平均	5.28	6.24	6.26	5.63
RSD(%)	0.27	0.63	0.71	1.09

2.5 黄连不同炮制品水煎剂的抑菌实验

培养基按配方比例煮沸溶解于蒸馏水中，调 pH 值后，在 121℃高压灭菌 15 min，冷却到 45~50℃后以无菌方式分装备用。采用混合法进行，将各炮制品水煎液的原液，分别用无菌蒸馏水作等倍稀释(1/2~1/32)，加入双倍营养琼脂混合，倾注成平板。将活化后的菌种接种于固体培养基上，分别挑选菌龄 12~16 h、浓度 80 万/ml 的实验菌液接种，在箱培养 37℃温度下培养。恒温培养 24 h，显微镜观察各细菌在不同药物浓度中生长情况，如果观察到不生长的药物时的浓度，即记录为该药液的最低抑菌浓度(MIC)。黄连不同炮制品的抑菌作用，以该药物的最低抑菌浓度来衡量其对常见细菌的体外抑菌效果。见表 2。

表 2　黄连及其不同炮制品对不同菌株的最低抑菌浓度(g/ml)

炮制方法	金黄色葡萄球菌	白色葡萄球菌	乙型溶血链球菌	沙门氏菌	变形杆菌	铜绿假单胞菌	平均 MIC
生黄连	0.05	0.05	0.05	0.03	0.05	0.01	0.40
酒黄连	0.04	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.23
姜黄连	0.05	0.05	0.01	0.01	0.03	0.03	0.30
萸黄连	0.05	0.05	0.05	0.01	0.03	0.01	0.33

由表 2 可知，不同炮制品中酒黄连平均 MIC 最低，为 0.23 g/ml，生黄连最高，为 0.40 g/ml。抗菌实验结果表明，生黄连及其不同炮制品对不同细菌显示了不同的抗菌特性。提示，黄连不同炮制品的水煎液对上述各菌株均有不同程度的抑制作用。

3 讨论

黄连及其炮制品中生物碱类化学成分复杂，在研究过程中，笔者考察了流动相的 pH、流速的变化、柱温的变化及样品不同制备方法、溶剂用量、不同提取时间。根据上述试验结果，确定了本研究中样品处理条件及色谱条件。本法简便易行、准确灵敏，重复性好，使用范围广，可用于检验、评价生黄连及其不同炮制品。

实验结果表明黄连经炮制后，其总生物碱的含量以盐酸小檗碱计，由强及弱的顺序为：姜黄连>酒黄连>萸黄连>生黄连。但从总体来说，各类型炮制品中盐酸小檗碱含量要大于生品，因此炮制对黄连中主要成分的含量有一定的影响。

黄连为大苦大寒之品，服用日久易败胃，临床中治疗痈疽肿毒常用生品，而治疗痢疾和腹泻则常用其炮制品，以防止其寒性太过。黄连中主要有效成分为小檗碱，其具有较强的抑菌作用。实验结果显示，不同炮制品和生品相比也都有一定程度的抑菌作用，但炮制品的抗菌作用稍强。本实验欲探讨黄酒、吴茱萸和生姜对黄连抗菌作用机制的影响，实验结果证明黄连炮制后具有明显的抑菌作用，不同炮制方法对黄连的抗菌作用产生了较大的影响，经炮制后黄连不但抑菌活性有不同程度的增强，且减弱其对肠胃道的不良作用，本研究为临床应用提供了科学依据，并为进一步的研究打下坚实基础。

[参考文献]

[1] 徐景堂,王立群,徐蓓.黄连研究进展[J].中国医学科学院学报,2004,26(6):704-707.
[2] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2007:160.
[3] 任世禾,杨春欣.黄连不同炮制品的质量考察[J].中药材,2007,30(8):915-917.
[4] 邹红,梅静,许腊英.不同炮制工艺对黄连中盐酸小檗碱含量的影响[J].湖北中医学院学报,2008,10(1):36-38.
[5] 钟凌云,杨金梅,龚千锋,等.不同辅料炮制对黄连生物碱类成分的影响[J].中药材,2010,33(2):195-198.
[6] 王红,徐卫宾.黄连不同炮制品体外抗金葡菌和痢疾杆菌实验[J].山东医药工业,2002,21(1):48-49.

(收稿日期:2011-08-11)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net